

06.12.2004

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 21 DEC 2004  
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 044 310.6  
Anmeldetag: 10. September 2004  
Anmelder/Inhaber: LEICA Microsystems Heidelberg  
GmbH, 68165 Mannheim/DE  
Bezeichnung: Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung  
IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. November 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Brosig

Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe.

- 5 Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe.

Aus US 2002/0097489 A1 ist ein Mikroskop mit evaneszenter Beleuchtung einer Probe bekannt. Das Mikroskop beinhaltet eine Weißlichtquelle, deren Licht über eine Schlitzblende durch das Mikroskopobjektiv hindurch in den 10 eine Probe tragenden Objektträger zur evaneszenten Beleuchtung eingekoppelt wird. Das Beleuchtungslicht pflanzt sich in dem Objektträger durch totalinterne Reflexion fort, wobei die Beleuchtung der Probe nur im Bereich des aus dem Objektträger herausragenden evaneszenten Feldes erfolgt. Mikroskope dieser Art sind unter dem Begriff TIRFM (Total Internal 15 Reflection Fluorescent Microscope) bekannt.

Die z-Auflösung von TIRF-Mikroskopen ist aufgrund des nur ca. 100 nm in die Probe ragenden evaneszenten Feldes außerordentlich gut.

Aus DE 101 08 796 A1 ist ein hochaperturiges Objektiv, insbesondere für TIRF-Anwendungen bekannt. Das Objektiv besteht aus einer ersten Linse mit

- einer positiven Brechkraft, einer zweiten Linse mit negativer Brechkraft, wobei das Brennweitenverhältnis zwischen den beiden Linsen im Bereich von - 0,4 und - 0,1 liegt und die Gesamtbrechkraft größer Null ist. Ferner beinhaltet das Objektiv zwei positive Linsen, deren Verhältnisdurchmesser zur Brennweite 5 größer 0,3 und kleiner 0,6 ist. Ferner beinhaltet das Objektiv eine Negativlinse und einer Sammellinse, wobei die Negativlinse der Frontgruppe zugewandt ist und das Brennweitenverhältnis der Negativlinse und der Sammellinse zwischen - 0,5 und - 2 liegt.
- Aus DE 102 17 098 A1 ist eine Auflichtbeleuchtungsanordnung für die TIRF- 10 Mikroskopie bekannt. Die Auflichtbeleuchtungsanordnung beinhaltet eine Beleuchtungsquelle, die im Betrieb ein polarisiertes Beleuchtungsstrahlenbündel abgibt, das unter einem Winkel zur optischen Achse propagiert und eine Umlenkeinrichtung, die das Beleuchtungsstrahlenbündel umlenkt und parallel zur optischen Achse in das 15 Objektiv einkoppelt. Es ist bei dieser Auflichtbeleuchtungsanordnung vorgesehen, dass das von der Beleuchtungsquelle abgegebene Beleuchtungsstrahlenbündel s- und p-Polarisationsrichtungen mit einer Phasendifferenz aufweist und die Umlenkeinrichtung das Beleuchtungsstrahlenbündel x-mal reflektiert, wobei  $x = (n \times 180^\circ - d)/60^\circ$ .
- Aus DE 101 43 481 A1 ist ein Mikroskop zur TIRM (Total Internal Reflection Microscopy) bekannt. Das Mikroskop weist ein Mikroskopgehäuse und ein Objektiv auf. Das von einer Beleuchtungseinrichtung ausgehende Beleuchtungslicht kann über einen in das Mikroskopgehäuse einschiebbaren Adapter eingekoppelt werden. 20
- Aus US 2004/0001253 A1 ist ein Mikroskop mit einem optischen Beleuchtungssystem, das ein einfaches Umschalten zwischen evaneszenter Beleuchtung und Reflektionsbeleuchtung ermöglicht. Das Beleuchtungssystem beinhaltet eine Laserlichtquelle, deren Licht in eine optische Faser eingekoppelt wird. Ferner ist eine Auskoppeloptik vorgesehen, 25 die das aus der Faser austretende Licht in einen hinteren Brennpunkt des Mikroskopobjektivs fokussiert. Die optische Faser ist in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs verschiebbar.
- 30

Aus DE 102 29 935 A1 ist eine Einrichtung zur Einkopplung von Licht in einem Mikroskop bekannt. Dabei wird in der Leuchtfeldblendenebene durch eine als Schieber ausgeführte Lichtleitfaser-Einkopplung Laserlicht auf das Präparat gerichtet. Die Erfindung ist insbesondere für das TIRF-Verfahren geeignet.

- In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahlenbündels wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkippung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet. Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahls in drei Dimensionen abgetastet.
- Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird Descan-Anordnung genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch

sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt.

- 5 Anordnungen, die das Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops ist unter anderem durch die Intensitätsverteilung und die räumliche Ausdehnung des Fokus des Anregungslichtstrahls gegeben. Eine Anordnung zur Steigerung des Auflösungsvermögens für Fluoreszenzanwendungen ist aus der PCT/DE/95/00124 bekannt. Hierbei
- 10 werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert
- 15 wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine Auflösungsverbesserung erreicht wird. Für dieses Verfahren hat sich die Bezeichnung STED (Stimulated Emission Depletion) eingebürgert.

- Beispielsweise aus US 2002/0167724 A1 und aus US 6,667,830 B1 ist eine
- 20 Variante der STED-Technik bekannt, bei der die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche mit dem Licht des zweiten Lasers zunächst weiter – nämlich in einen dritten Zustand – angeregt werden. Bei dieser Variante, für die sich auch der Begriff „up-conversion“ eingebürgert hat, wird äquivalent zu der Variante der direkten stimulierten Abregung in den Grundzustand eine
- 25 Auflösungssteigerung erzielt.

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-Mikroskopie ist eine Technik, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ein großer Vorteil ist, dass die Proben nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen. Außerdem können lebende Zellen untersucht werden.

- 30 Im Vergleich zur herkömmlichen Raman-Mikroskopie und der bekannten konfokalen Raman-Mikroskopie kann man bei der CARS-Mikroskopie eine

- höhere Ausbeute an Detektionslicht erzielen, störende Nebeneffekte besser unterdrücken und das Detektionslicht leichter vom Beleuchtungslicht trennen.
- Für die konventionelle konfokale Raman-Spektroskopie wird ein Detektionspinhole benötigt, um eine gute axiale Auflösung zu erreichen, sowie
- 5 ein hochauflösendes Spektrometer. CARS dagegen ist ein nichtlinearer optischer Prozess (Vierwellen-Mischprozess). Ähnlich, wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie, bei der zwei oder mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden, wird, da die Wahrscheinlichkeit des Phasenrichtigen gleichzeitigen Zusammentreffens mehrerer Photonen im Fokus auf Grund der
- 10 höheren Photonendichte am größten ist, kein Detektionspinhole benötigt. Ohne Detektionspinhole wird die gleiche axiale Auflösung erzielt wie bei der Multiphotonen-Mikroskopie. Für die CARS-Spektroskopie werden üblicherweise 2 Laser, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren ( $\nu_p$  und  $\nu_s$ , Pump- und Stokeslaser), benutzt, wobei  $\nu_s$  durchstimmbar sein sollte,
- 15 um ein CARS-Spektrum  $\nu_{CARS}$  zu erzeugen ( $\nu_{CARS} = 2\nu_p - \nu_s$ ,  $I_{CARS} \sim (I_p)^2 \cdot I_s$ ). Stimmt die Differenzfrequenz  $\nu_p - \nu_s$  mit der Differenzfrequenz zwischen zwei molekularen Vibrationszuständen  $|1\rangle$  und  $|0\rangle$  in der Probe überein, so ist das
- CARS-Signal sogar noch verstärkt. Der Pumplichtstrahl und der
- 20 Stokeslichtstrahl werden bei mikroskopischen Anwendungen koaxial vereinigt und gemeinsam auf dasselbe Probenvolumen fokussiert. Die Richtung, in der die Anti-Stokes-Strahlung emittiert wird, ergibt sich aus der Phasenanpassungsbedingung für den Vier-Wellen-Mischprozess.
- Aus der US-Patentschrift 4,405,237 „Coherent anti-Stokes Raman device“ ist eine Vorrichtung bekannt, bei der zwei gepulste Laserstrahlen, die von zwei
- 25 Lasern erzeugt werden und die unterschiedliche Wellenlängen im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich des Spektrums aufweisen, genutzt werden, um eine Probe simultan zu beleuchten. Bei geeigneter Wahl der Wellenlängen kann die Probe derart angeregt werden, dass sie die charakteristische Coherent anti-Stokes Raman-Strahlung emittiert.
- 30 Aus James W.M. Chon, Min Gu, „Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: Image

formation", Appl. Opt. 43, 1063-1071, 2004 und aus Florian Schapper, José T. Gonçalves, Martin Oheim, "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation", Eur. Biophys. J. 32, 635-643, 2003 ist bekannt eine evaneszent beleuchtete Probe über einen 5 Zweiphotonenprozess anzuregen.

Die bislang bekannten Techniken zur evaneszenten Probenbeleuchtung erlauben lediglich die Probenschichten zu untersuchen, die direkt an das Deckglas bzw. direkt an den Objektträger angrenzen.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskop anzugeben, das 10 eine weitgehend flexible Probenuntersuchung, insbesondere auch der Bereiche, die nicht unmittelbar an das Deckglas oder an den Objektträger angrenzen, zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe 15 evaneszent beleuchtet.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur – insbesondere rastermikroskopischen - Untersuchung einer Probe anzugeben, die weitgehend flexibel ist und sich nicht auf die Probenschichten beschränkt, die unmittelbar an das Deckglas bzw. an den Objektträger angrenzen.

20 Die weitere Aufgabe wird durch ein Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten gelöst:

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
- Beleuchten der Probe mit dem der ersten und der zweite Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste 25 Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsvariante weist das Mikroskop 30 ein Objektiv mit einer Objektivpupille auf, wobei der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel im Bereich der Objektivpupille einen Fokus aufweist. Vorzugsweise ist ein Einstellmittel vorgesehen, mit dem die

- räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist. Das Einstellmittel kann beispielsweise eine Strahlablenkeinrichtung mit mehreren Dreh- oder Kippspiegeln oder mit einem kardanisch aufgehängten Spiegel umfassen. Das Einstellmittel kann auch als akustooptisches Element ausgebildet sein oder Mikrospiegel beinhalten. Zum Einstellen der räumlichen Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels kann auch eine verschiebbare Lichtleitfaser dienen.
- Der Winkel bezüglich der optischen Achse des Objektivs, unter dem der zur evaneszenten Beleuchtung der Probe vorgesehene Beleuchtungslichtstrahlenbündel das Objektiv verlässt, hängt von der räumlichen Position des Fokus in der Objektivpupille ab. Der Winkel ist umso größer, je größer der Abstand des jeweiligen Fokus von der optischen Achse ist. Daher ist erfindungsgemäß insbesondere der Abstand des Fokus von der optischen Achse des Objektivs zur Einstellung des Winkels und damit zur Einstellung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe einstellbar.
- In einer bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist um eine CARS-Untersuchung einer Probe zu realisieren. Der erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel, ein Stokeslichtstrahls.
- In einer anderen, ganz besonders bevorzugten Ausgestaltungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops ist insbesondere zur Erzielung einer hohen Ortsauflösung das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein Anregungslichtstrahlenbündel zur optischen Anregung eines ersten Probenbereichs und der zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel ein Stimulationslichtstrahlenbündel zum Auslösen einer stimulierten Emission oder zum Auslösen einer weiteren Anregung, wobei die stimulierte Emission und/oder die weitere Anregung in einem weiteren zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich stattfindet.
- Besonders bevorzugt ist eine Variante, bei der das

- Anregungslightstrahlenbündel und das Stimulationslightstrahlenbündel beide die Probe evaneszent beleuchten, wobei das Anregungslightstrahlenbündel eine größere Eindringtiefe aufweist als das Stimulationslightstrahlenbündel.
- Um dies zu realisieren, wird der Abstand des Fokus des
- 5 Anregungslightstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse des Objektivs größer gewählt, als der Abstand des Fokus des Stimulationslightstrahlenbündels in der Objektivpupille von der optischen Achse. Durch den relativ tiefer eindringenden Anregungslightstrahlenbündel wird die Probe in einer an das Deckglas bzw. an den Objekträger
- 10 angrenzenden relativ breiten Schicht optisch angeregt und durch den Stimulationslightstrahl in einer relativ schmäleren, an den Objekträger bzw. an das Deckglas angrenzenden –mit der ersten Schicht überlappenden- Schicht stimuliert, optisch abgeregelt, so dass letztlich weitgehend ausschließlich Fluoreszenzphotonen aus dem Teil der mit dem Anregungslightstrahlenbündel
- 15 beleuchteten Schicht detektiert werden, die nicht von dem Stimulationslightstrahlenbündel beleuchteten Schicht räumlich überlagert ist.
- In einer anderen erfindungsgemäß Variante wird die Probe von dem Anregungslightstrahlenbündel evaneszent beleuchtet und von dem direkt beleuchteten Stimulationslightstrahlenbündel optisch stimuliert abgeregelt. Das
- 20 Stimulationslightstrahlenbündel ist hierbei vorzugsweise derart manipuliert, dass der Fokus des Stimulationslightstrahlenbündels innen hohl ausgebildet ist. Ein Hohlfokus ist beispielsweise mit Hilfe von Phasenfiltern, die in einer zur Fokalebene des Objektivs konjugierten Ebene (Fourierebene) angeordnet sind. Als Phasenfilter kann beispielsweise eine  $\lambda/2$ -Platte fungieren, die von
- 25 dem Stimulationslightstrahl überleuchtet wird, so dass nur der innere Teilbereich des Stimulationslightstrahlenbündels durch die  $\lambda/2$ -Platte verläuft, während der äußere Ring an der  $\lambda/2$ -Platte vorbei verläuft. Letztlich werden die Fluoreszenzphotonen detektiert, die aus dem vom Anregungslightstrahlenbündel evaneszent beleuchteten Teilbereich der Probe
- 30 stammen, der im inneren des Hohlfokus des Stimulationslightstrahlenbündels liegt. Auf diese Weise kann eine Abrasterung der Probe mit einer sehr hohen Ortsauflösung erfolgen. In z-Richtung ist die Ortsauflösung durch die

- Eindringtiefe des evaneszent beleuchteten Anregungslichtstrahls gegeben (z.B. 100 nm), während in den axialen Richtungen das Auflösungsvermögen durch die Abmessungen des Hohlfokus bestimmt sind. Zum Abrastern der Probe wird der Fokus des Stimulationslichtstrahlenbündels vorzugsweise mit
- 5 einer Strahlablenkeinrichtung, vorzugsweise mäanderförmig über bzw. durch die Probe geführt.
- In einer besonderen Ausgestaltungsviante erfolgt durch das Stimulationslichtstrahlenbündel eine weitere Anregung der bereits angeregten Probenbereiche in einem dritten Anregungszustand. Auch diese Variante ist
- 10 geeignet, um eine hohe Ortsauflösung zu erzielen.
- Vorzugsweise ist das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst. Hierzu kann beispielsweise zumindest eine gepulste Lichtquelle, wie ein modernverkuppelter Pulslaser (z.B. Titansaphirlaser) vorgesehen sein. Auch
- 15 die Verwendung von gepulsten Halbleiterlasern oder von regenerativen Verstärkern ist beispielsweise möglich.
- Von besonderem Vorteil ist eine Ausgestaltungsform, bei der das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel und das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel zeitlich gepulst sind, wobei der zeitliche
- 20 Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels einstellbar ist. In dieser Variante können beispielsweise zwei Lichtquellen aufeinander synchronisiert sein, wobei der zeitliche Abstand der Pulse durch einstellbare Verzögerungsstrecken einstellbar ist. In einer anderen Variante kann auch das
- 25 Licht des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels und das Licht des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels von einer einzigen Lichtquelle entstammen, die einen aufzuteilenden Primärlichtstrahl emittiert, wobei vorgesehen sein kann, dass in den aufgeteilten Lichtzweigen eine Wellenlängenveränderung (OPO; mikrostrukturierte Faser; Frequenzvervielfachung) oder eine
- 30 Leistungsveränderung (z.B. Verstärker oder Abschwächer) erfolgt.

Das erfindungsgemäße Mikroskop weist vorzugsweise zumindest eine

- Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle auf. Vorzugsweise sind die Wellenlängen bzw. ist die Wellenlänge des ersten Beleuchtungslightstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslightstrahlenbündels einstellbar. Es ist erfindungsgemäß möglich, dass der erste Beleuchtungslightstrahlenbündel und auch der zweite Beleuchtungslightstrahlenbündel Licht einer oder mehrerer Wellenlängen beinhalten kann, wobei sich die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslightstrahlenbündels und des zweiten Beleuchtungslightstrahlenbündels voneinander unterscheiden können.
- 10 In einer besonders bevorzugten Variante ist der Durchmesser des ersten Beleuchtungslightstrahlenbündels und/oder des zweiten Beleuchtungslightstrahlenbündels einstellbar. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Öffnungswinkel des zu einem in der Objektivpupille liegenden Fokus zusammenlaufenden Beleuchtungslightstrahlenbündels einstellbar ist. Durch Änderung des Öffnungswinkels bei der Fokussierung in die Objektivpupille ändert sich die Größe der Fläche, die evaneszent beleuchtet wird. Wählt man die Fläche der durch den Stimulationslichtstrahl evaneszent beleuchteten Fläche so, dass sie kleiner ist als die von dem evaneszent anregenden Beleuchtungslightstrahlenbündel beleuchtete Fläche, so kann man einen direkten Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in unmittelbarer Nähe der Objektträgeroberfläche zu den Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in tiefergelegenen Schichten erhalten.
- 25 Bei einer vorteilhaften Variante wird die Probe mit einer evaneszenten Anregungs-Beleuchtung mit einer relativ hohen Eindringtiefe beleuchtet werden. Mit einer evaneszenten STED-Beleuchtung (Stimulationslichtstrahlenbündel), die eine geringe Eindringtiefe aufweist (größerer Eintrittswinkel in den Objektträger), wird eine Fluoreszenz direkt am Objektträger stimuliert abgeregelt. Die Aufnahme des Fluoreszenzbildes erfolgt zeitlich später (time-gated CCD), so dass nur Fluoreszenzphotonen aus tiefer liegenden Probenschichten detektiert werden. Die Einstellung der jeweiligen Tiefen sind sogar einstellbar, indem die radialen Positionen der beiden

Beleuchtungslichtfokusse in der Objektivpupille variiert werden. Die Beleuchtungslichtintensität in der Probe nimmt bei TIRF exponentiell mit der Eindringtiefe ab. Umso effektiver ist der STED-Effekt direkt an der Objektträgeroberfläche, so dass z.B. Proben schichten ab 100nm Tiefe

5 vermessen werden können.

Vorzugsweise sind vor dem Detektor (beispielsweise Multibanddetektor), der beispielsweise als Kamera ausgestaltet sein kann, Bandpassfilter und/oder Kantenfilter angeordnet auf die jeweilige Emissionsbandweite des Fluoreszenzsignals durch abgestimmt sind. Zur Farbselektion kann ein  
10 dispersives Element vorgesehen sein, dass eine spektrale Aufspaltung erzeugt, aus der die zu detektierenden Wellenlängenanteile ausgeblendet werden. Der Detektor kann auch als Farbdetektor, beispielsweise als Farbkamera ausgestaltet sein. Genauso ist es möglich, dass ein dispersives Element das Detektionslicht auf mehrere Detektoren aufteilt, um eine  
15 Spektraldetektion zu erreichen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Mikroskop ein Rastermikroskop; insbesondere ein konfokales Rastermikroskop.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und  
20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Mikroskop und

Fig. 2 Eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur Erläuterung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

25

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Mikroskop mit einer ersten Lichtquelle 1, die ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 erzeugt. Das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel gelangt zu einer ersten Strahlablenkeinrichtung 5, die einen kardanisch aufgehängten Drehspiegel 7  
30 beinhaltet und wird von dieser Strahlablenkeinrichtung zu einer ersten Optik 9,

einer zweiten Optik 11 und einer dritten Optik 13 geführt und von einem Strahlteiler 15, der als dichroitischer Strahlteiler 17 ausgeführt ist, zu dem Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das Mikroskopobjektiv 19 weist eine hintere Brennebene (Objektivpupillenebene 21) auf. Das erste

5 Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 weist in der Objektivpupillenebene 21 einen als Punkt dargestellten Fokus 23 auf. Das Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 wird zur evaneszenten Beleuchtung der Probe 25 in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Zwischen dem Objektträger und dem Objektiv 19 befindet sich ein Immersionsmittel 29. Das Mikroskop

10 weist eine zweite Lichtquelle 31, die ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 emittiert auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 gelangt über eine zweite Strahlablenkeinrichtung 35, die einen zweiten kardanisch aufgehängten Drehspiegel 37 beinhaltet, zur ersten Optik 9, zur zweiten Optik 11 und zur

15 dritten Optik 13 und wird von dem Strahlteiler 15 zum Mikroskopobjektiv 19 gelenkt. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 weist in der Objektivpupillenebene einen Fokus 39 auf. Das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 wird ebenfalls zur evaneszenten Probenbeleuchtung in den Objektträger 27 eingekoppelt. Das erste

20 Beleuchtungslichtstrahlenbündel verlässt das Mikroskopobjektiv 19 unter einem Winkel  $\alpha$  zur optischen Achse 41 des Objektivs 19, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 das Objektiv 19 unter einem Winkel  $\beta$  verlässt. Der Winkel  $\alpha$  ist durch Verändern des Abstandes des ersten Fokus 23, des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 zur optischen Achse 41

25 des Objektivs 19 einstellbar. Analog ist der Winkel  $\beta$  durch Verändern des Abstandes des zweiten Fokus 39 von der optischen Achse 41 einstellbar. Die Einstellung der Position des ersten Fokus 23 und des zweiten Fokus 39 erfolgt mit Hilfe der ersten Strahlablenkeinrichtung 5 bzw. mit Hilfe der zweiten Strahlablenkeinrichtung 35, die vorzugsweise jeweils in einer zur

30 Objektivpupillenebene 21 korrespondierenden Ebene angeordnet sind. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Beleuchtung direkt vom Winkel  $\alpha$  bzw. vom Winkel  $\beta$  abhängt, kann mit Hilfe der ersten Strahlablenkeinrichtung 5 bzw. mit

Hilfe der zweiten Strahlablenkeinrichtung 35 die jeweilige Eindringtiefe des ersten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 3 und des zweiten Beleuchtungslichtstrahlenbündels 33 eingestellt werden.

- In dieser Ausgestaltungsvariante ist das erste Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3 ein Anregungslichtstrahlenbündel 43, während das zweite Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33 ein Stimulationsstrahlenbündel 45 ist. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 regt einen ersten schichthaften Probenbereich der Probe 25 an. Das Stimulationslichtstrahlenbündel 45 weist Licht einer Wellenlänge auf, die zum Auslösen einer stimulierten Emission angeregter Probenmoleküle geeignet ist. Die Eindringtiefe des evaneszenten Stimulationsbeleuchtungslichtes ist in dieser Variante geringer als die Eindringtiefe des evaneszenten Anregungsbeleuchtungslichtes. Die erste Lichtquelle 1 ist als gepulster Titansaphirlaser 47 ausgeführt. Die zweite Lichtquelle 31 ist ebenfalls gepulst und beinhaltet einen nicht gezeigten Titansaphirlaser, der einen nicht gezeigten OPO (Optisch parametrischen Oszillator) speist. Die erste Lichtquelle 1 und die zweite Lichtquelle 31 sind derart aufeinander synchronisiert, dass zunächst mit einem Puls des Anregungslichtstrahlenbündels 3 eine Probenanregung erfolgt und anschließend mit dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 in einer mit der Anregungsschicht überlappenden ProbenSchicht eine stimulierte Emission ausgelöst wird. Letztlich detektiert werden von dem Detektor 51, der als CCD-Kamera 53 ausgeführt ist, die Fluoreszenzphotonen, die aus dem nicht von dem Licht des Stimulationslichtstrahlenbündels 31 beaufschlagten Anregungsbereich des Anregungslichtstrahlenbündels 3 stammen. Das aus diesem Bereich stammende Detektionslicht 55 gelangt durch das Mikroskopobjektiv 19 zu dem Strahlteiler 15, passiert diesen, um anschließend auf die CCD-Kamera 53 zu treffen.
- Fig 2 zeigt eine Detailansicht eines erfindungsgemäßen Mikroskops zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel 3, das ein Anregungslichtstrahlenbündel 43 ist, ist zu einem ersten Fokus 23 fokussiert. Nach Durchlaufen des

Mikroskopobjektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Anregungslichtstrahlenbündel das Objektiv als Parallelstrahlenbündel und wird zur evaneszenten Probenbeleuchtung in einen Objektträger 27 eingekoppelt. Ein zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel 33, das ein 5 Stimulationslichtstrahlenbündel 45 ist, wird zu einem zweiten in der Objektivpupillenebene 21 liegenden zweiten Fokus 39 fokussiert. Nach Durchlaufen des Objektivs 19 (gestrichelt angedeutet) verlässt das Stimulationslichtstrahlenbündel 45 als Parallelstrahlenbündel. Das Anregungslichtstrahlenbündel 43 verlässt das Objektiv 19 unter einem 10 größeren Winkel zur optischen Achse des Objektivs als das Stimulationslichtstrahlenbündel 45; demgemäß ist die Eindringtiefe des Lichtes des Anregungslichtstrahlenbündels 43 in die Probe 25 größer als die Eindringtiefe des Lichtes des Stimulationslichtstrahlenbündels 45. Der zu dem ersten Fokus 23 des Anregungslichtstrahlenbündels 43 zusammenlaufende 15 Lichtkegel weist einen Öffnungswinkel  $\varphi_1$  auf, während der zu dem zweiten Fokus 39 zusammenlaufende Lichtkegel des Stimulationslichtstrahlenbündels 45 einen Öffnungswinkel  $\varphi_2$  aufweist, der kleiner als  $\varphi_1$  ist; folglich ist der Durchmesser des das Objektiv 19 verlassenden Anregungslichtstrahlenbündels größer als der Durchmesser des das Objektiv 20 19 verlassenden Stimulationslichtstrahlenbündels 45. Demgemäß ist die von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete axiale Fläche der Probe 25 größer als die von dem Stimulationslichtstrahlenbündel 45 evaneszent beleuchtete Probenfläche. Mit dieser Anordnung ist es möglich, Vergleiche der Fluoreszenzeigenschaften von Probenschichten in 25 unmittelbarer Nähe des Objektträgers 27 und tiefer gelegener Schichten zu ziehen. Der von dem Anregungslichtstrahlenbündel 43 evaneszent beleuchtete erste Probenbereich 57 wird von dem Licht des Anregungslichtstrahlenbündels 43 optisch angeregt (schraffiert eingezeichnet). Der von dem Stimulationslichtstrahlenbündel 45 evaneszente 30 zweite Probenbereich 59 ist kleiner als der erste Probenbereich 57 und überlappt zumindest teilweise mit diesem. In diesem zweiten Probenbereich 59 wird eine gestimulierte Emission ausgelöst und erst danach die spontan emittierten Photonen mit dem nicht gezeigten (gegateten) Detektor detektiert.

Die detektierten Photonen stammen im wesentlichen aus dem Teil des ersten Probenbereichs 57, der nicht mit dem zweiten Probenbereich 59 überlappt.

- Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
- 5 Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

- 1 erste Lichtquelle
- 3 erstes Beleuchtungslichtstrahlenbündel
- 5 5 erste Strahlablenkeinrichtung
- 7 kardanisch aufgehängter Drehspiegel
- 9 erste Optik
- 11 zweite Optik
- 13 dritte Optik
- 10 15 Strahlteiler
- 17 dichroitischer Strahlteiler
- 19 Mikroskopobjektiv
- 21 Objektivpupillenebene
- 23 Fokus
- 15 25 Probe
- 27 Objektträger
- 29 Immersionsmittel
- 31 zweite Lichtquelle
- 33 zweites Beleuchtungslichtstrahlenbündel
- 20 35 zweite Strahlablenkeinrichtung
- 37 zweiter kardanisch aufgehängter Drehspiegel
- 39 Fokus
- 41 optische Achse
- 43 Anregungslichtstrahlenbündel
- 25 45 Stimulationsstrahlenbündel

- 47      Titansaphirlaser
- 51      Detektor
- 53      Kamera
- 55      Detektionslicht
- 5        57      erster Probenbereich
- 59      zweiter Probenbereich

Patentansprüche

1. Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl zum Beleuchten einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.  
5
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Objektiv mit einer Objektivpupille aufweist, und dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille einen Fokus aufweist.
- 10 3. Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Einstellmittel vorgesehen ist, mit dem die räumliche Position des Fokus innerhalb der Ebene der Objektivpupille veränderbar ist.
4. Mikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels 15 angeordnete einstellbare Strahlablenkeinrichtung umfasst.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus von der optischen Achse des Objektivs – insbesondere zur Einstellung der Eindringtiefe in die Probe bei evaneszenter Beleuchtung – einstellbar ist.
- 20 6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch 25 gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden

Probenbereich, ist.

8. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslichtstrahl und der Stimulationslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchten und dass der Anregungslichtstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslichtstrahl.  
5
9. Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslichtstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslichtstrahls von der optischen Achse.  
10
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst ist.  
11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslichtstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.  
15
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.  
20
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop zumindest eine Mehrlinienlichtquelle und/oder zumindest eine Breitbandlichtquelle aufweist und die Wellenlänge bzw. die Wellenlängen des ersten Beleuchtungslichtstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls einstellbar ist.  
25
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Rastermikroskop insbesondere ein konfokales Rastermikroskop ist.  
15.
15. Verfahren zur – insbesondere mikroskopischen -Untersuchung einer Probe mit folgenden Schritten:  
30

- Erzeugen eines ersten und eines zweiten Beleuchtungslichtstrahls
  - Beleuchten der Probe mit dem der ersten und der zweite Beleuchtungslichtstrahl, wobei zumindest der erste Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.
- 5      16.      Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtung durch das Objektiv eines Mikroskops erfolgt, wobei der erste Beleuchtungslichtstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl im Bereich der Objektivpupille des Objektivs einen Fokus aufweist.
- 10     17.      Verfahren nach Anspruch 16, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Einstellen der räumliche Position des Fokus des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtstrahls innerhalb der Ebene der Objektivpupille mit einem Einstellmittel.
- 15     18.      Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Einstellmittel eine im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahlenbündels angeordnete einstellbare Strahlablenkeinrichtung umfasst.
19.      Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, gekennzeichnet durch den Schritt:
- 20     20.      Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur CARS-Untersuchung der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl ist.
- 25     21.      Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungslichtstrahl zum optischen Anregen eines ersten Probenbereichs ist und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stimulationslichtstrahl zum Auslösen einer stimulierten Emission oder einer weiteren Anregung in einem

weiteren, zumindest teilweise mit dem ersten Probenbereich überlappenden Probenbereich, ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungslightstrahl und der Stimulationslightstrahl die Probe evaneszent 5 beleuchten und dass der Anregungslightstrahl eine größere Eindringtiefe aufweist, als der Stimulationslightstrahl.
23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand des Fokus des Anregungslightstrahl von der optischen Achse des Objektivs größer ist, als der Abstand des Fokus Stimulationslightstrahls von 10 der optischen Achse.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungslightstrahl und/oder der zweite Beleuchtungslightstrahl zeitlich gepulst ist.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der 15 erste Beleuchtungslightstrahl und der zweite Beleuchtungslightstrahl zeitlich gepulst sind und dass die zeitliche Abstand der Pulse des ersten Beleuchtungslightstrahls zu den Pulsen des zweiten Beleuchtungslightstrahls eingestellt wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch 20 gekennzeichnet, dass der Durchmesser des ersten Beleuchtungslightstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslightstrahls einstellt wird.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 26, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:
- Einstellen der Wellenlänge bzw. der Wellenlängen des ersten 25 Beleuchtungslightstrahls und/oder des zweiten Beleuchtungslightstrahls.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 27, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Mikroskops, insbesondere eines Rastermikroskops oder eines konfokalen Rastermikroskops.

Zusammenfassung

Ein Mikroskop mit einem ersten und einem zweiten Beleuchtungslichtstrahl  
5 zum Beleuchten einer Probe ist dadurch gekennzeichnet, dass der erste  
und/oder der zweite Beleuchtungslichtstrahl die Probe evaneszent beleuchtet.  
Zur CARS-Untersuchung kann der erste Beleuchtungslichtstrahl ein  
Pumplichtstrahl und der zweite Beleuchtungslichtstrahl ein Stokeslichtstrahl  
sein. Zur Erzielung einer Auflösungssteigerung kann der erste  
10 Beleuchtungslichtstrahl ein Anregungs und der zweite Beleuchtungslichtstrahl  
ein Stimulationslichtstrahl sein.

Fig. 1

15

**Fig. 1**

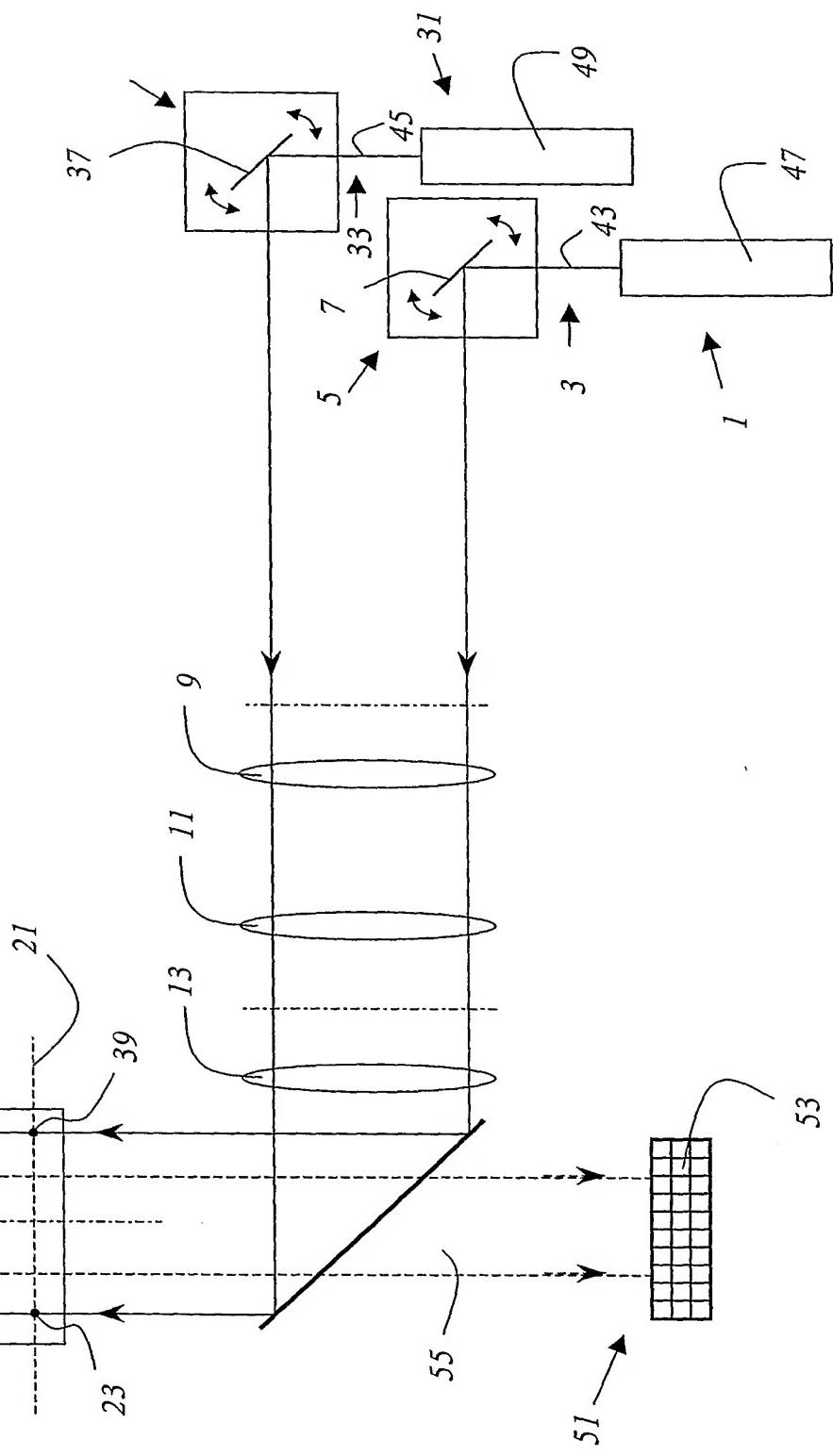


Fig. 2

